

小白菊内酯及顺铂对人结肠癌细胞 SW620 凋亡和增殖的作用

余南荣,李昌宾,纪术峰,吴爱国

(南方医科大学珠江医院,广东 广州 510282)

摘要: [目的] 探讨小白菊内酯及顺铂对人结肠癌细胞 SW620 增殖及凋亡的影响。[方法] 不同浓度的小白菊内酯和顺铂分别处理 SW620 细胞,MTT 法检测细胞增殖的变化情况,流式细胞仪检测细胞凋亡的情况。[结果] 小白菊内酯和顺铂对 SW620 细胞增殖均具有抑制作用;分别作用 48h 后,小白菊内酯和顺铂对 SW620 细胞增殖的抑制作用呈浓度依赖性;5 μ mol/L 顺铂联合 10 μ mol/L 小白菊内酯作用 SW620 细胞时,对细胞增殖具有协同抑制作用。小白菊内酯和顺铂可以诱导 SW620 细胞凋亡。[结论] 小白菊内酯和顺铂联用具有协同作用,能抑制 SW620 细胞增殖并诱导细胞凋亡。

主题词: 小白菊内酯;顺铂;SW620 细胞;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号: R735 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)04-0277-04

The Effect of Parthenolide and Cisplatin on Proliferation and Apoptosis in Human Colon Cancer Cell SW620

YU Nan-rong, LI Chang-bin, JI Shu-feng, et al.

(Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of parthenolide and (or) cisplatin on proliferation and apoptosis in human colon cancer cell SW620. [Methods] After 48h treated by parthenolide and (or) cisplatin with different concentrations, the proliferation of SW620 cells was determined by MTT assay, and the cell apoptosis was examined by flow cytometry. [Results] Parthenolide and cisplatin were capable of inhibiting SW620 cells proliferation, and the inhibition was dose-dependent. Parthenolide 5 μ mol/L and cisplatin 10 μ mol/L synergistically inhibited the proliferation of SW620 cells. The cell apoptosis also could be induced by parthenolide and (or) cisplatin. [Conclusion] Parthenolide and cisplatin have synergistical effects on inhibiting cell proliferation and inducing cell apoptosis of SW620 cells.

Subject words: parthenolide; cisplatin; SW620 cell; proliferation; apoptosis

结肠癌的治疗主要是以手术、化疗为主的综合治疗,但临床上有多数患者因对化疗药物敏感性较低而疗效不佳。小白菊内酯(parthenolide)是从菊科植物中提取的一种倍半萜内酯化合物,近年来体外研究发现其具有较强的抗肿瘤活性,可抑制多种肿瘤细胞的增殖,并诱导其凋亡,譬如肝癌、胆管癌及多发性骨髓瘤等^[1,2]。同时还可增强某些肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,如增强肝癌细胞对顺铂的敏感

性^[3]。本研究以人结肠癌细胞 SW620 作为研究对象,旨在研究小白菊内酯及顺铂对结肠癌细胞凋亡及增殖的影响,为将来的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

人结直肠癌细胞 SW620 购自中国科学院上海细胞库;小白菊内酯购自 Sigma 公司,顺铂购自齐鲁制药厂;胎牛血清、RPMI 1640 培养基为 Hyclone 产品;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自凯基

通讯作者: 吴爱国,主任医师,博士生导师;南方医科大学珠江医院普外科,广东省广州市海珠区工业大道中 253 号(510282);E-mail: wagtyz@sina.com。

收稿日期: 2012-10-15; **修回日期:** 2013-01-04

生物;cellTiter 96 AQ 单溶液细胞增殖检测试剂为 Promega 公司产品。流式细胞仪为 BD 公司生产;酶标仪生产商是 Thermo Fisher Scientific, 型号是 multiscan MK3。

1.2 实验方法

1.2.1 MTT 法检测细胞增殖抑制率

将对数期生长的 SW620 细胞消化后,计数,调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml,分到 96 孔板,每孔 100 μ l(约 1×10^4 个细胞),常规培养,待细胞贴壁后进行药物处理。实验分为:空白对照组、溶剂对照组(DMSO 组)、不同浓度小白菊内酯组(5 μ mol/L、10 μ mol/L、15 μ mol/L、20 μ mol/L)、不同浓度顺铂组(2.5 μ mol/L、5 μ mol/L、7.5 μ mol/L、10 μ mol/L)、小白菊内酯和顺铂联合组(顺铂 5 μ mol/L+小白菊内酯 10 μ mol/L、顺铂 5 μ mol/L+小白菊内酯 20 μ mol/L、顺铂 10 μ mol/L+小白菊内酯 10 μ mol/L、顺铂 10 μ mol/L+小白菊内酯 20 μ mol/L)。收集药物作用 0h、24h、48h、72h 的细胞,以 1:10 的比例加入 MTT,即 100 μ l 培养液加入 10 μ l 检测液。孵育 4h 后,酶标仪读板,MTT 检测读取 OD₄₉₀ 数据。金正均法计算 q 值判断两药物是否具有协同作用^[4],公式: $q=EAB/EA+EB-EA\times EB$,其中 EAB 为联合处理组的抑制率,EA、EB 分别为 A 药和 B 药单独处理的抑制率。若 q 值在 0.85~1.15 间为两药合用单纯相加,若 $q>1.15$ 为有协同作用,若 $q<0.85$ 表示两药合用有拮抗作用。

1.2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率

将 SW620 细胞接种于 6 孔板,实验分为溶剂对照组、小白菊内酯组(10 μ mol/L)、顺铂组(5 μ mol/L)、小白菊内酯+顺铂组(10 μ mol/L+5 μ mol/L)。药物处理 48h 后收样进行流式细胞凋亡检测。胰酶消化细胞后,用预冷的 PBS 清洗细胞,将细胞轻轻重悬于预冷的 1 $\times$ 结合缓冲液中使得其密度大约为 1×10^6 个/ml。加入 1.25 μ l Annexin V-FITC。室温(18 $^{\circ}$ C~24 $^{\circ}$ C)避光反应 15min。室温 800r/min 离心 5min,去除上清。将细胞用 0.5ml 预冷的 1 $\times$ 结合缓冲液轻轻重悬,加入 10 μ l Propidium Iodide,冰上避

光保存。立即用流式细胞仪检测分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。组间均数比较采用配对 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 检测结果

结果提示,小白菊内酯及顺铂均对 SW620 细胞的增殖有抑制作用($P<0.05$)(Table 1)。与顺铂相比,5 μ mol/L 小白菊内酯作用 48h 对 SW620 细胞增殖的抑制作用强于顺铂(Figure 1)。二者对 SW620 细胞的增殖抑制作用均表现出浓度依赖性。联合作用时对 SW620 细胞的增殖抑制作用较单药作用时增强。金正均法检测显示,5 μ mol/L 顺铂联合 10 μ mol/L 小白菊内酯组的 q 值大于 1.15,表示两药物存在协同作用;其他组合的 q 值介于 0.85~1.15 之间,为两药作用相加(Table 2)。

2.2 流式细胞凋亡检测结果

流式细胞仪检测显示,小白菊内酯和顺铂单用组的凋亡率显著高于溶剂对照组,二者联用组细胞

Table 1 Inhibition of parthenolide and cisplatin on the proliferation of SW620 Cell at 24h,48h,72h

Groups	Inhibition rate (%)		
	24h	48h	72h
DMSO	-4.23 $\pm$ 0.34	-1.37 $\pm$ 0.25	-1.09 $\pm$ 0.02
5 μ mol/L PTL	39.81 $\pm$ 2.64*	60.25 $\pm$ 4.53*	87.82 $\pm$ 5.36*
10 μ mol/L PTL	57.45 $\pm$ 5.25*	68.23 $\pm$ 5.36*	88.48 $\pm$ 5.21*
15 μ mol/L PTL	57.45 $\pm$ 4.23*	70.80 $\pm$ 4.98*	88.26 $\pm$ 5.38*
20 μ mol/L PTL	56.97 $\pm$ 5.32*	71.94 $\pm$ 6.32*	88.53 $\pm$ 6.21*
2.5 μ mol/L DDP	18.73 $\pm$ 2.39*	36.31 $\pm$ 3.36*	53.62 $\pm$ 2.38*
5 μ mol/L DDP	18.50 $\pm$ 1.58*	43.36 $\pm$ 2.36*	63.81 $\pm$ 4.25*
7.5 μ mol/L DDP	18.89 $\pm$ 2.01*	48.43 $\pm$ 2.37*	71.07 $\pm$ 3.58*
10 μ mol/L DDP	15.67 $\pm$ 1.03*	58.84 $\pm$ 4.21*	76.23 $\pm$ 5.69*
10 μ mol/L PTL +5 μ mol/L DDP	64.34 $\pm$ 4.29*	88.24 $\pm$ 5.36*	89.59 $\pm$ 4.52*
20 μ mol/L PTL +5 μ mol/L DDP	63.32 $\pm$ 2.36*	81.63 $\pm$ 5.98*	89.49 $\pm$ 4.25*
10 μ mol/L PTL +10 μ mol/L DDP	63.71 $\pm$ 3.69*	82.06 $\pm$ 4.72*	89.28 $\pm$ 6.32*
20 μ mol/L PTL +10 μ mol/L DDP	62.77 $\pm$ 4.20*	81.92 $\pm$ 4.20*	89.32 $\pm$ 4.52*

Note: PTL:parthenolide; *:P<0.05.

Table 2 q value of different concentration of parthenolide and cisplatin on SW620 cells

Groups	Inhibition rate (%)	q value	Combined effect
10 μ mol/L PTL +5 μ mol/L DDP	88.24 $\pm$ 5.36	1.27	Synergism
20 μ mol/L PTL +5 μ mol/L DDP	81.63 $\pm$ 5.98	0.96	Addition
10 μ mol/L PTL +10 μ mol/L DDP	82.06 $\pm$ 4.72	0.95	Addition
20 μ mol/L PTL +10 μ mol/L DDP	81.92 $\pm$ 4.20	0.93	Addition

Note: PTL:parthenolide.

凋亡率高于单药组(Figure 2)。溶剂对照组、小白菊内酯组、顺铂组和小白菊内酯与顺铂联用组早期凋亡的比例分别为 1.25%、5.69%、3.65%和 8.36%,晚期凋亡的比例却变化不大,分别为 5.21%、6.58%、6.03%和 7.86%。

3 讨论

结肠癌是常见的恶性肿瘤之一,在欧美及中国都有很高的发病率。目前,针对该病的治疗主要是采用手术的方法。而对于中晚期结肠癌患者,手术联合

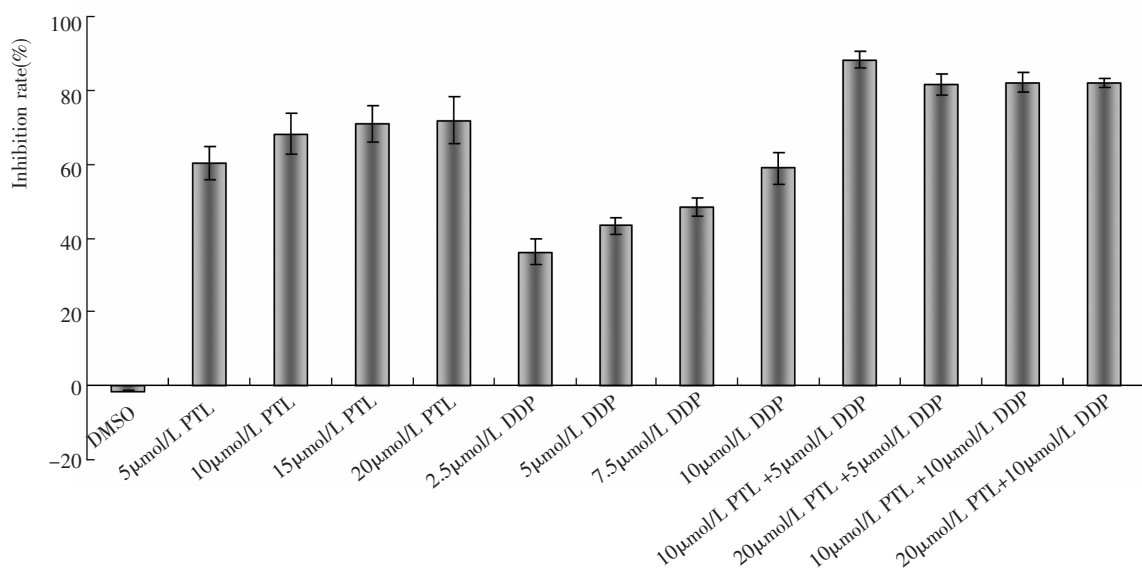


Figure 1 The inhibition of parthenolide and cisplatin on the proliferation of SW620 Cell at 48h

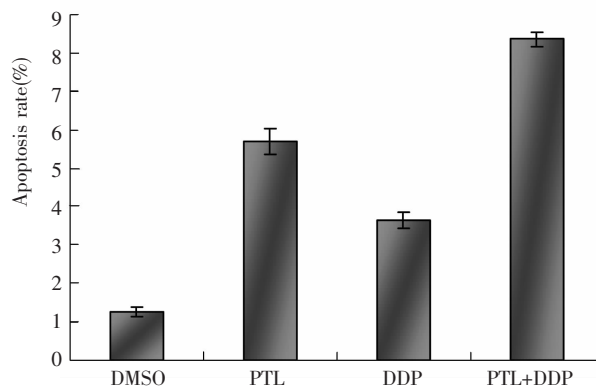
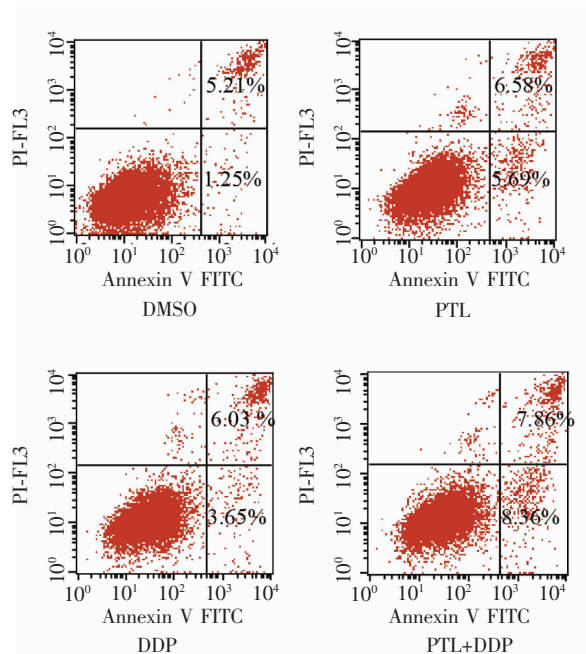


Figure 2 Cell apoptosis of SW620 cells treated with parthenolide and cisplatin after 48h

化疗等综合治疗则是较好的治疗选择。但仍有较多结肠癌细胞对化疗药物敏感性较低, 临床治疗效果不佳。如何提高结肠癌细胞对化疗药物的敏感性、减少临床化疗药的用量, 进而减少化疗相关不良反应具有重要的临床意义。

小白菊内酯是一种从菊科植物中提取的倍半萜内酯, 最早被用于发热及关节炎等疾病的治疗^[5,6]。近年来, 该提取物也逐渐被应用到肿瘤研究领域。研究发现, 小白菊内酯具有较强的抗肿瘤活性, 在体外可抑制多种肿瘤细胞的增殖, 并诱导其凋亡^[7-9]。还可以增强肝癌细胞对顺铂的敏感性^[3]。但其对结肠癌细胞的影响研究较少。本研究选择 SW620 细胞作为研究对象, 以不同浓度小白菊内酯和顺铂处理 SW620, 实验结果显示, 小白菊内酯和顺铂均能有效抑制 SW620 细胞的增殖, 且顺铂的抑制作用呈浓度依赖性。有研究表明, 20 $\mu\text{mol/L}$ 小白菊内酯可以显著抑制 MDA-MB-231 细胞增殖, 但 10 $\mu\text{mol/L}$ 小白菊内酯对该细胞的增殖没有明显影响^[10]。本实验中 5 $\mu\text{mol/L}$ 小白菊内酯就可以显著抑制 SW620 细胞的增殖, 说明 SW620 细胞对小白菊内酯的敏感性较高。加大小白菊内酯的处理浓度对 SW620 细胞增殖能力的影响不大。在联合处理实验中, 我们采用多种浓度组合对 SW620 细胞进行处理, 并采用金正均法对结果进行分析, 结果显示, 只有 5 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂联合 10 $\mu\text{mol/L}$ 小白菊内酯一种组合的 q 值大于 1.15, 显示二者对细胞增殖的作用表现为协同效应。

小白菊内酯除能抑制 SW620 细胞增殖外, 还对 SW620 细胞凋亡亦产生影响。本实验中, 流式细胞检测结果显示小白菊内酯和顺铂均能诱导细胞凋亡, 且小白菊内酯对 SW620 细胞凋亡的影响大于顺铂。同时, 小白菊内酯与顺铂联合作用时可以提高 SW620 细胞对顺铂的敏感性。当然, 小白菊内酯能否在临床实践中提高结肠癌患者对顺铂或其他化疗药的敏感性, 减少化疗药的用量等还需进一步临床研究证实。

参考文献:

- [1] Imaizumi T, Hanyu F, Harada N, et al. Extended radical whipple resection for cancer of the pancreatic head: operative procedure and results [J]. *Dig Surg*, 1998, 5(4):299-307.
- [2] Cubilla AL, Fortner J, Fitzgerald PJ. Lymph node involvement in carcinoma of the head of the pancreas area [J]. *Cancer*, 1978, 41(3):880-887.
- [3] Wang XY, Leng SL. Experimental investigation of parthenolide enhancing the sensitivity of liver HepG2 cells to cisplatin [J]. *Journal of Practical Medicine*, 2011, 27(2):177-180. [王秀英, 冷水龙. 小白菊内酯增强肝癌 HepG2 细胞对顺铂敏感性的实验研究 [J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(2):177-180.]
- [4] Jin ZJ. Addition in drug combination [J]. *Acta Pharmaceut Sin*, 1980, 1(2):70-72.
- [5] Duffey DC, Chen Z, Dong G, et al. Expression of a dominant-negative mutant inhibitor-kappaB alpha of nuclear factor-kappa B in human head and neck squamous cell carcinoma inhibits survival, proinflammatory cytokine expression, and tumor growth in vivo [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(14):3468-3474.
- [6] Knight DW. Feverfew: chemistry and biological activity [J]. *Nat Prod Rep*, 1995, 12(3): 271-276.
- [7] Wei W, Adachi M, Kawamura R, et al. Parthenolide induced apoptosis in multiple myeloma cells involves reactive oxygen species generation and cell sensitivity depends on catalase activity [J]. *Apoptosis*, 2006, 11(120): 2225-2235.
- [8] Kim JH, Liu L, Lee SO, et al. Susceptibility of cholangiocarcinoma cells to parthenolide-induced apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(6):312-320.
- [9] Park JH, Liu L, Kim IH, et al. Identification of the genes involved in enhanced fenretinide-induced apoptosis by parthenolide in human hepatoma cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(70): 2804-2814.
- [10] Li CJ, Guo SF, Shi TM. Culture supernatants of breast cancer cell line MDA-MB-231 treated with parthenolide inhibit the proliferation, migration, and lumen formation capacity of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125(12):2195-2199.